



Facultad de Veterinaria  
**Universidad** Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Presencia de Clostridioides difficile en conejos y buitres.

Presence of Clostridioides difficile in rabbits and wild griffon vultures.

Autor/es

Ana Isabel Abad Fau

Director/es

D<sup>a</sup> Rosa Bolea Bailo

## Índice de contenido

Resumen .....	3
Abstract.....	4
Introducción.....	5
Generalidades .....	5
Factores de virulencia de <i>C. difficile</i> : toxinas.....	5
Toxinas A y B .....	6
Toxina binaria.....	7
Tipificación de <i>C. difficile</i> : ribotipado.....	7
Resistencia a antibióticos y su uso en la producción animal .....	9
Transmisión y patogenia .....	10
Enfermedad en los humanos y su potencial como zoonosis .....	11
Justificación y objetivos .....	13
Metodología.....	13
Muestreo.....	13
Aislamiento de <i>C. difficile</i> .....	13
Caracterización genética .....	14
Estudio de susceptibilidad antimicrobiana .....	16
Resultados.....	17
1. Especie cunícola .....	17
2. <i>Gyps fulvus</i> (Buitres) .....	18
Discusión .....	20
1. Especie cunícola .....	20
2. <i>Gyps fulvus</i> (Buitres) .....	21
Conclusiones .....	23
Conclusions .....	24
Valoración personal .....	25
Consideraciones éticas.....	25
Bibliografía .....	26

## Índice de figuras

Figura 1. ....	6
Figura 2 .....	10
Figura 3 .....	16
Figura 4 .....	17
Figura 5 .....	18
Figura 6 .....	19
Figura 7. ....	19

## Índice de tablas

Tabla 1.....	15
Tabla 2.....	16
Tabla 3.....	18
Tabla 4.....	19

## **Resumen**

En los últimos años se ha evidenciado un cambio en la epidemiología de la enfermedad producida por *Clostridium difficile* en humanos, principalmente asociado a la aparición de nuevos ribotipos hipervirulentos y al aumento de la incidencia de infecciones adquiridas en comunidad. Uno de los posibles factores sospechosos de favorecer este cambio es que los animales tengan un papel en la transmisión de este patógeno, convirtiendo a *C. difficile* en un agente zoonótico. Este trabajo se centra en el análisis de muestras de dos orígenes distintos: buitres alimentados con cadáveres de cerdo y granjas de conejos. El objetivo es caracterizar los aislados obtenidos para ampliar la información existente en España, donde existen pocos estudios sobre el tema. La metodología utilizada se basa en el aislamiento de *C. difficile* en dichas muestras, estudiando posteriormente su prevalencia, ribotipo, presencia de toxinas y susceptibilidad antibiótica. Aunque la información obtenida es limitada debido al bajo tamaño de muestra, los resultados son similares a los obtenidos en otros estudios, por lo que se apunta la posibilidad de que *C. difficile* tenga implicación en transmisiones interespecie y carácter zoonótico, destacando en este último caso el papel del ribotipo hipervirulento 078. Los resultados obtenidos sobre el nivel de resistencia de los aislados señalan una elevada resistencia a fluoroquinolonas, destacando el caso de los procedentes de buitres, ya que no son animales que reciban tratamientos antibióticos a lo largo de su vida a diferencia de los animales de ganadería. Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de continuar trabajando en planes de control de este patógeno y reducción de resistencias a antibióticos.

## **Abstract**

In recent years the epidemiology of *Clostridium difficile* in human infection has changed, mainly related to the appearance of new hypervirulent ribotypes and the increase in the prevalence of community-acquired infections. One possible factor that could favor this change is animals being part of the transmission of this pathogen, making *C. difficile* a zoonotic agent. This study focuses on the analysis of samples from two different sources: vultures fed with pig carcasses and rabbit farms. The objective is to characterize the obtained isolates to expand the existing information in Spain, where few studies have been performed on this topic. Methodology is based on the isolation and study of *C. difficile* in these samples, followed by the study of its prevalence, ribotype, toxin presence and antibiotic susceptibility. Although the obtained information is limited due to the small sampling, the obtained conclusions match those of similar studies, which seems to suggest the possibility of *C. difficile* having some implication in potential interspecies transmission as well as a zoonosis, in which the hypervirulent ribotype 078 could be especially relevant. Obtained results about the antibiotic resistance of the isolates show high resistance to fluoroquinolones, having special importance the vultures' results, because these animals are not treated with antibiotics along its life, unlike livestock animals. These results confirm the need of continuing the existing work of fight against antibiotic resistance.

## **Introducción**

### **Generalidades**

*Clostridium difficile* es una bacteria que forma parte de la familia *Clostridiaceae*, aunque recientemente se ha propuesto su reclasificación como parte de la familia *Peptostreptococcaceae* (Lawson et al., 2016). Son bacilos Gram positivos, fermentativos, catalasa y oxidasa negativos, anaerobios estrictos y con capacidad de formar esporas. La familia *Clostridiaceae* se compone de microorganismos ubiquitarios y saprofitos, que generalmente forman parte de la flora intestinal normal de los animales y seres humanos. Sin embargo, en algunas especies su presencia se asocia a infecciones graves, como es el caso de *C. difficile*, capaz de producir toxinas (Quinn et al., 2011).

*C. difficile* es capaz de fermentar azúcares simples, mientras que la utilización de otros nutrientes como hidrocarburos complejos, nitrógeno, fósforo orgánico, azufre o nitrógeno de origen peptídico varían según la cepa (Scaria et al., 2014). Además, requiere medios de cultivo específicos para crecer, como agar sangre o agar Brucella, y su temperatura óptima de crecimiento es de 30-37 °C, aunque puede crecer entre 25 y 45 °C. La presencia de glicina y derivados del colato facilita la germinación de las esporas (Di Bella et al., 2016). Dichas esporas favorecen la presencia del microorganismo en el medio, ya que le proporcionan resistencia a numerosos agentes, teniendo especial relevancia la resistencia al alcohol (Edwards et al., 2016).

Este patógeno ha sufrido un cambio en su epidemiología en los últimos años, incrementándose la severidad de los casos y la prevalencia de infecciones adquiridas en comunidad, por lo que es un campo de estudio relevante tanto en Sanidad Animal como en Salud Pública.

### **Factores de virulencia de *C. difficile*: toxinas**

Aunque la patogenicidad de *C. difficile* es multifactorial, gran parte de su poder patógeno se debe a su potencial de generar toxinas, si bien también existen otros factores implicados, como la presencia de una cápsula que protege a la bacteria de la fagocitosis.

## Toxinas A y B

Las cepas toxigénicas pueden producir dos tipos de toxinas, la toxina A y la toxina B, codificadas por los genes *tcdA* y *tcdB* respectivamente. Estos genes se encuentran localizados en el locus denominado PaLoc (*Pathogenicity Locus*), una isla de patogenicidad integrada en el cromosoma. Además, existen genes reguladores de estas toxinas en este mismo locus, como los genes *tcdC* (posible regulador negativo de la producción de toxinas), *tcdE* (relacionado con la secreción de toxinas) o *tcdR* (regulador positivo de la expresión de las toxinas) (Lyon et al., 2016). El PaLoc es una región de 19.6 Kb, cuya presencia varía según las cepas, estando presente en las cepas toxigénicas y ausente en las no toxigénicas (Elliot et al., 2014). Además, se ha observado que el PaLoc puede transferirse de forma horizontal a cepas no toxigénicas (caracterizadas por la ausencia de *tcdA* y *tcdB*), a pesar de no estar aparentemente localizado en un elemento móvil (Di Bella et al., 2016).

Las toxinas A y B son proteínas de cadena única con cuatro dominios distintos: GTD (el dominio N-glucotransferasa terminal), CPD (dominio cisteín proteasa), TD (dominio de translocación) y RBD (dominio receptor de adhesión C terminal) (Shan et al., 2015). El principal mecanismo patogénico de estas toxinas se basa en la alteración de la estructura del citoesqueleto de las células del epitelio intestinal y de las uniones entre ellas, produciendo así la tumefacción de las células y finalmente su muerte.

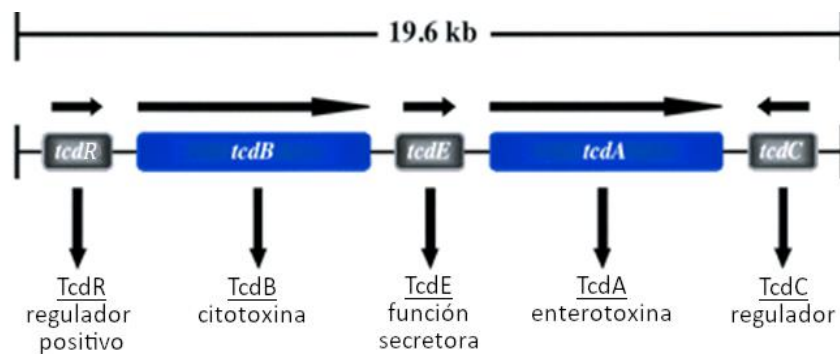


Figura 1: Esquema del PaLoc adaptado de Voth et al., 2005, en el que se muestra la posición de los genes relacionados con las toxinas.

### Toxina binaria

Aunque es menos frecuente que las anteriores, algunas cepas de *C. difficile* pueden producir una toxina conocida como toxina binaria (CDT). La mayoría de estas cepas productoras también son capaces de producir las toxinas A y B. Aunque sus implicaciones en la patogenia no han sido totalmente determinadas, las principales hipótesis indican que participa en la misma (Di Bella et al., 2016). La toxina binaria está compuesta por las subunidades A y B, codificada por los genes *cdtA* y *cdtB*. Esta toxina también está presente en cepas que no presentan PaLoc, ya que no se encuentra en esta región, sino que se encuentra en una región de 6.2 kb llamada CdtLoc (Gerding et al., 2014).

### **Tipificación de *C. difficile*: ribotipado**

El tipado molecular se ha utilizado para estudiar diversas bacterias patógenas. Las posibilidades que ofrecen estos estudios son muy amplias, ya que se pueden utilizar para caracterizar brotes de enfermedades, estudio de la transmisión, prevalencia o el análisis del poder patógeno, entre otras.

En el caso de *C. difficile*, existen diversas herramientas para su estudio, entre las que se encuentran el MLST, PFGE o el PCR-ribotipado, que es el más utilizado en los estudios europeos.

El MLST, siglas de *multilocus sequence typing*, es una técnica que consiste en amplificar mediante PCR distintas secuencias de nucleótidos de fragmentos de genes constitutivos. A cada combinación de nucleótidos (alelos) se le asigna un número ST (Griffithset al., 2009). Los genes analizados son siete, que se mantienen estables ya que carecen de inserciones, deleciones o alelos nulos (PubMLST, 2018).

El PFGE (*pulse field gel electrophoresis*) consiste en utilizar la técnica de electroforesis de campo pulsado para separar grandes fragmentos de ADN en función de su tamaño. Para ello es necesario un gel capaz de separar hasta 2 Mb, aunque presenta ventajas como una menor posibilidad de contaminación del ADN durante el procedimiento. Es la prueba de elección en Norte América (Gebreyes y Adkins, 2015).

Por último, el PCR-ribotipado se basa en la amplificación de las ISR (región espaciadora intergénica). Esta región es heterogénea entre los genes *16S* y *23S* del ADN ribosomal bacteriano, con lo que permite diferenciar los distintos ribotipos de *C. difficile* al presentar distintos tamaños de bandas. El tipo de electroforesis utilizado en este caso es la electroforesis capilar (Fawley et al, 2015).

Aún no están claros los mecanismos implicados en el cambio de la epidemiología de este microorganismo, pero es de especial interés la emergencia de cepas hipervirulentas, como las pertenecientes a los ribotipos 027 y 078.



### Ribotipo 027

Este ribotipo ha sido el causante de epidemias recientes (Canadá, 2005; Países bajos y Francia 2006), con una frecuencia de casos superior a la esperada para las cepas endémicas. La mayor severidad de las infecciones que origina, junto con su peor respuesta al tratamiento con antibióticos, hace que se considere un ribotipo hipervirulento de *C. difficile*. Desde entonces, otros estudios realizados han demostrado su expansión por otras zonas de Europa, Norteamérica y otras zonas de Asia.

Existen varias hipótesis sobre las causas del aumento de la virulencia, entre las que se incluyen el aumento del potencial infeccioso y de la gravedad de la sintomatología con respecto a las cepas endémicas o un aumento de la capacidad de competición respecto a otras cepas, ya sea a través de un mayor potencial de invasión o gracias al incremento en la resistencia a antibióticos (presión de selección) (Yakob et al., 2015).

### Ribotipo 078

Es el ribotipo predominante en animales, incluyendo la especie porcina, y el más abundante en muestras procedentes de productos cárnicos (Goorhuis et al., 2007). Además, de acuerdo con un estudio llevado a cabo por Fairley et al. en 2015 en muestras de casos humanos con sintomatología clínica, las cepas de este ribotipo se asociaron a niveles de toxinas detectables más frecuentemente que otras cepas. En un estudio llevado a cabo en los hospitales del sur de España (Arca-Suárez et al., 2018), el ribotipo más frecuentemente encontrado fue el 078. Por ello tiene un especial interés en el estudio de *C. difficile* y de su potencial zoonótico. Otros estudios (Knetsch, 2018) han encontrado numerosas relaciones genómicas entre las cepas humanas y animales, asociándolo a una transmisión entre la especie humana y animales de ganadería.

La prevalencia de este ribotipo en cerdos es en general elevada, y varios estudios lo asocian a animales con diarrea, como Kim et al. en 2018 o Stein et al. en 2017. En el primer estudio realizado en Corea, la prevalencia fue de 19.3%, destacando la variación de la prevalencia en cerdos con diarrea fue de 30.4 frente a 13.3% de los animales sanos, siendo la mayoría de las cepas toxigénicas pertenecientes a este ribotipo. En el segundo, realizado en Irlanda, de las muestras positivas el 67% fue del ribotipo 078. En el 2015, Dringo et al. encontraron una prevalencia en conejos de *C. difficile* del 3 %, perteneciendo el 7.9% de las cepas a este ribotipo. En un estudio realizado en España en 2009 por Alvarez-Perez et al. la prevalencia en cerdos fue de 25.9% en los 7 primeros días de edad.

El ribotipo 126 es un ribotipo estrechamente relacionado con el 078, y ambos pertenecen a la misma secuencia tipo (ST11), que se ha aislado tanto en personas como animales (Knight et al., 2019)

## **Resistencia a antibióticos y su uso en la producción animal**

*C. difficile* tiene una elevada versatilidad genética, principalmente debido al elevado número de elementos móviles dentro de su genoma. Esto se asocia con una elevada facilidad para presentar y transferir genes de resistencia antibiótica.

Aunque el nivel de resistencias varía según la zona geográfica y los protocolos utilizados, los estudios más recientes concluyen en un incremento de la resistencia antibiótica de este patógeno en los últimos años. En estudios realizados en humanos, se encontró resistencia a clindamicina y cefalosporinas en un 55% y 51%, respectivamente, seguido muy de cerca por la resistencia a eritromicina y fluoroquinolonas (47%). Cuando se testaron estas cepas frente a cefalosporinas se encontraron diferencias entre la prevalencia de resistencia a cefalosporinas de segunda generación (79%) y las de tercera generación (38%). La diferencia entre la prevalencia de resistencia frente a las fluoroquinolonas de segunda y cuarta generación también fue destacable, encontrándose un 99% frente a ciprofloxacina, mientras que a las de cuarta generación se encontró un 34% (Spigaglia, 2016). En el caso de los animales, aunque los patrones varían según la especie, se han obtenido resultados similares, teniendo especial relevancia la resistencia a clindamicina (Peláez et al., 2013; Peng et al., 2017).

Es importante mencionar que en el caso del metronidazol, antibiótico de elección en los casos de enfermedad humana, se ha detectado un descenso en la susceptibilidad de las cepas. También se han notificado casos de fallo del tratamiento (Vardakaset al, 2014). Además, las cepas no toxigénicas podrían considerarse una fuente de genes de resistencia antibiótica para las cepas toxigénicas (Vardakas et al., 2012).

### Antibióticos utilizados en España

En España, los antibióticos más utilizados varían según la especie de destino. Según el informe de 2018 de la ESVAC (European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption) sobre las ventas de antibióticos para uso veterinario en 2016, los grupos de antibióticos más vendidos en España fueron las tetraciclinas y penicilinas, siendo la mayoría de los antibióticos dedicados a la industria porcina (ya que España es uno de los mayores productores mundiales de ganado porcino).

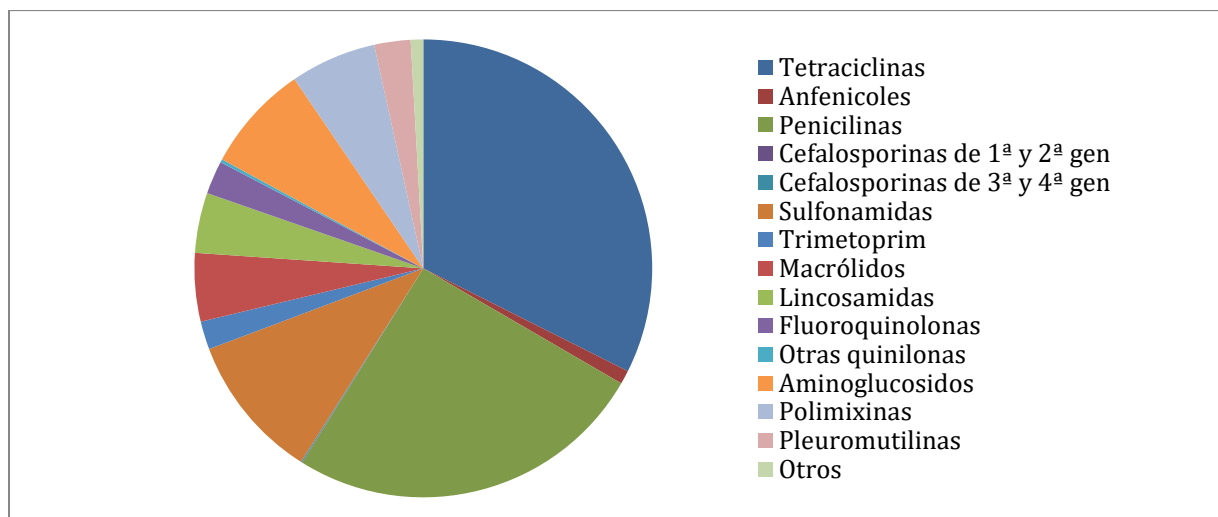


Figura 2: Gráfico explicativo sobre el consumo de antibióticos en España en 2016 (datos obtenidos de ESVAC, 2018)

Un estudio realizado por De Briyne en 2014 reveló que los antibióticos más utilizados en la industria porcina corresponden a las penicilinas (31 %), tetraciclinas (15 %) y macrólidos (13 %).

### Transmisión y patogenia

La infección comienza con la ingestión de las esporas del agente. Estas esporas son capaces de resistir las condiciones del estómago, por lo que alcanzan fácilmente el intestino delgado. Una vez allí, donde existen condiciones de anaerobiosis, germinan a la forma vegetativa y colonizan el intestino. Sin embargo, *C. difficile* no es capaz de invadir el intestino en condiciones normales, sino que necesita un cambio de ambiente, de forma que las condiciones sean desfavorables para las bacterias normales del intestino, como ocurre tras los tratamientos prolongados de antibióticos en el caso de la infección en humanos. Las lesiones suelen concentrarse en la zona de ciego y colon (Goudarzi et al., 2014).

Las células vegetativas se adhieren a las células del epitelio intestinal. *C. difficile* es capaz de producir fimbrias, que son considerados mediadores en la adhesión (Krishna et al., 1996).

Posteriormente, las cepas toxigénicas producen toxinas. Estas toxinas actúan destruyendo las uniones intracelulares, lo que provoca un aumento de la permeabilidad, tumefacción celular y finalmente muerte celular. Tras la apoptosis se produce la liberación de factores de inflamación, que dañan el tejido y hacen que se desarrolle colitis y diarrea acuosa. La presencia de neutrófilos, fibrina, mucina y fibrina produce la aparición de pseudomembranas en el caso de las personas (Shan et al., 2015).

Son numerosas las especies en las que se ha asociado la infección por *C. difficile* con un cuadro clínico, cursando con distintas lesiones y sintomatología según la especie animal. Por ejemplo, en lechones se han descrito lesiones producidas principalmente en ciego y colon ascendente, sin afectar al intestino delgado, dando lugar a diarreas neonatales (Yaeger et al., 2007). En el conejo las lesiones se producen en intestino delgado, provocando en algunos casos la muerte aguda (Perkins et al., 1995)

### **Enfermedad en los humanos y su potencial como zoonosis**

Históricamente la vía de transmisión más descrita es la transmisión en el ambiente hospitalario, especialmente debido a la ingestión de formas esporuladas. Uno de los factores que favorecen su presencia en el ambiente, objetos o manos de los trabajadores, es el uso intrahospitalario de jabón en base de alcohol, que, como muestran Jabbar et al. en 2010, es poco efectivo para eliminar *C. difficile* debido a la resistencia al alcohol de sus esporas. Sin embargo, otras fuentes de infección podrían ser los animales y la comida, el agua de mar y ríos, piscinas o incluso el agua corriente (Asensio et al., 2012).

La enfermedad se asocia principalmente a 3 grupos de riesgo: (1) mayores de 65 que toman antibióticos y reciben tratamiento médico, (2) personas que permanecen hospitalizadas por tiempo prolongado y (3) personas inmunocomprometidas o con infecciones previas por *C. difficile* (CDC, 2015). El cuadro clínico que se presenta tras la infección es variable, desde diarrea leve o moderada a colitis pseudomembranosa fulminante, megacolon tóxico y muerte, dependiendo del estado de la persona y de la virulencia de la cepa (Marín-Arriaza et al., 2016).

Si bien todavía no se ha establecido de manera definitiva su carácter zoonótico, algunos estudios, como el de Bauer et al. en 2015 establecen como posible fuente de infección a los animales y la carne. En un estudio realizado en 2014 por Knetsch et al., en el que se secuenció el genoma de cepas

de *C. difficile* de humanos y animales, se observó una estrecha relación genética entre cepas de origen humano y animal. Estos estudios, junto con el incremento de la prevalencia en humanos de las infecciones adquiridas en comunidad, parecen indicar su potencial como agente zoonótico. En el caso de enfermedades transmitidas por alimentos, cabe destacar que su capacidad para formar esporas y su elevada resistencia en el ambiente facilitaría este tipo de transmisión, aunque actualmente no hay información suficiente para demostrar la existencia de la vía alimentaria.

## **Justificación y objetivos**

El objetivo general de este trabajo es determinar la prevalencia y caracterización de *C. difficile* en la especie cunícola y conocer si los buitres pueden ser portadores de este patógeno. El fin de este objetivo principal es ampliar el conocimiento sobre este tema, ya que existen pocos estudios realizados en España sobre el mismo, y comparar los datos obtenidos con la información existente.

Además, la importancia de este estudio reside, entre otros factores, en la necesidad de obtener información para comprender los cambios epidemiológicos que se han sucedido en los últimos años en las infecciones por *C. difficile*, prestando especial atención a las posibles resistencias a antibióticos que puedan existir debido a su importancia en Salud Pública y Sanidad Animal.

Para ello, se desarrollan unos objetivos específicos que consisten en:

1. Conocer la presencia de *C. difficile* en conejos y en buitres alimentados con canales de cerdos.
2. Caracterización genética de las cepas aisladas.
3. Estudio de su susceptibilidad antimicrobiana.

## **Metodología**

### **Muestreo**

Para este estudio se han analizado un total de 86 muestras de animales, de las cuales 54 son muestras correspondientes a hisopos cloacales de buitres (*Gyps fulvus*), los cuales eran alimentados con cadáveres de cerdos en la región de Castellón, y 32 son muestras de hisopos rectales de conejos (*Oryctolagus cuniculus*) sanos y con signos diarreicos procedentes de 8 granjas dedicadas a la producción de carne para consumo humano.

### **Aislamiento de *C. difficile***

Para realizar el aislamiento bacteriano se siguió un protocolo diseñado en la Unidad de Microbiología de la Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza (Andrés-Lasheras et al., 2016a). Este protocolo se inicia con el cultivo de los hisopos en un caldo selectivo para *C. difficile* (9 ml), durante seis días a 37 °C en anaerobiosis. Una vez pasado este tiempo de incubación, se obtienen 2 ml del caldo y se adicionan a 2 ml de etanol 96% y se deja durante una hora a temperatura ambiente (choque etílico). Después, se centrifuga a 4000 rpm durante 20 minutos y se cultiva el pellet por agotamiento en agar CLO (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) en anaerobiosis durante 48 horas a

37 °C, cuando se realiza una primera lectura. A las 72 horas se realiza una segunda lectura en caso de no observarse crecimiento.

Los criterios para valorar una muestra como positiva se basan principalmente en la morfología de las colonias y olor típico. También se realiza una tinción Gram y se valora al microscopio.

De las muestras positivas se toman 3 colonias aisladas y se almacenan en crioviales almacenados a -30 °C.

### **Caracterización genética**

Para extraer el ADN de las cepas aisladas se utilizó el kit Favor Prep Blood Genomic DNA Extraction Mini Kit (FavorgenEurope, Vienna, Austria), siguiendo las instrucciones recomendadas. Para ello se añaden 20 µl de Proteinasa K y 200 µl del Buffer FABG a la suspensión bacteriana y se mezcla con el rotatubos. Se incuba a 60 °C durante 15 minutos y se añaden 200 µl de alcohol de 96°. Después, se centrifuga a 6,000 rpm durante un minuto y se coloca la columna en un nuevo tubo de recolección. Se añaden 400 µl de Buffer W1 a la columna y se centrifuga durante 30 segundos, eliminando luego el sobrenadante. A continuación, Se añaden 750 µl de Buffer de limpieza a la columna y se centrifuga de nuevo. Por último, se coloca la columna un tubo eppendorf, se añaden entre 50 y 200 µl de agua ultrapura a la membrana del tubo y se centrifuga a velocidad máxima durante un minuto para obtener el ADN.

En aquellos aislados obtenidos (un aislado por muestra positiva) se llevó a cabola técnica de PCR para confirmar que se de esta especie bacteriana y detectar los genes codificantes de las toxinas A, B y binaria en el caso de cepas toxigénicas (Persson et al., 2008). Para la obtención de su ribotipo se utilizó la técnica de PCR-ribotipado en electroforesis capilar (CE-typing) (Fawley et al., 2015). Los primers utilizados durante la PCR para detectar los genes de las toxinas se detallan en la tabla 1.

Tabla 1: se indican los genes, el nombre de los primers, su secuencia, concentración y tamaño de los fragmentos amplificados.

Gen	Nombre del primer	Secuencia (5'-3')	Concentración del primer (μL)	Tamaño (bp)
<b><i>tcdA</i></b>	tcdA-F3345	GCATGATAAGGCAACTTCAGTGGTA	0.6	629
	cdA-R3969	AGTTCCTCCTGCTCCATCAAATG	0.6	
<b><i>tcdB</i></b>	tcdB-F5670	CCAAARTGGAGTGTTACAAACAGGTG	0.4	410
	tcdB-R6079A	GCATTTCTCCATTCTCAGCAAAGTA	0.2	
	tcdB-R6079B	GCATTTCTCCGTTTTTCAGCAAAGTA	0.2	
<b><i>cdtA</i></b>	cdtA-F739A	GGGAAGCACTATATTAAAGCAGAAGC	0.05	221
	cdtA-F739B	GGGAAACATTATATTAAAGCAGAAGC	0.05	
	cdtA-R958	CTGGGTTAGGATTATTTACTGGACCA	0.1	
<b><i>ctdB</i></b>	ctdB-F617	TTGACCCAAAGTTGATGTCTGATTG	0.1	262
	ctdB-R878	CGGATCTCTTGCTTCAGTCTTTATAG	0.1	
<b>16S rDNA</b>	PS13	GGAGGCAGCAGTGGGGAATA	0.05	1062
	PS14	TGACGGGCGGTGTGTACAAG	0.05	

La técnica de PCR se realiza en volúmenes de 25 μL, que contienen el buffer de la PCR (50 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.3) con los dNTPs y la Taq polimerasa, y los primers especificados en la Tabla 1 en las concentraciones dadas. Las condiciones del termociclador son 10 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 50 segundos a 94 °C, 40 segundos a 54 °C y 50 segundos a 72 °C, finalizando con 3 minutos a 72 °C.

La amplificación de los genes *tcdA* y *tcdB* busca detectar la presencia de la toxina A y B, respectivamente, y la amplificación de los genes *cdtA* y *cdtB* la de la toxina binaria. El gen *tpi* es un gen constitutivo de *C. difficile*. El rDNA 16S está presente en todas las cepas de *C. difficile* y por ello sirve de control de la amplificación.

Además de añadir el ADN de las muestras, se añade una muestra control negativo y dos muestras de control positivo, consistente en un ADN aislado previamente de una cepa control positiva a los genes de las tres toxinas (RT078) y otra positiva a los genes *tcdA* y *tcdB* (ATCC 43255).

Para la interpretación se tiene en cuenta el tamaño de los fragmentos amplificados, de modo que se observan como se muestra en la Figura 3.





Figura 3: Cada banda está asociada a una altura diferente en el gel al tener distinto tamaño en pares de bases (bp)

### Estudio de susceptibilidad antimicrobiana

También se realizó un antibiograma para determinar su susceptibilidad a antibióticos en los aislados obtenidos, mediante la prueba de epsilometría o E-test.

Para ello se siembra en masa en agar sangre Brucella y se coloca una tira de cada antibiótico (clindamicina, eritromicina, metronidazol, moxifloxacina, tetraciclina, vancomicina y ciprofloxacina). La primera lectura se realiza a las 48 horas tras su incubación en anaerobiosis, y para determinar la posible heterorresistencia a metronidazol se realiza una segunda lectura a las 72 horas de la primera.

Para determinar la susceptibilidad de las muestras a los antibióticos se han tenido en cuenta los siguientes puntos de corte (CLSI, 2014) indicados en la tabla 2.

Tabla 2: puntos de corte para los antibióticos utilizados

Antibiótico	Rango (µg/ml)	Punto de corte
Clindamicina	0.016-256	≥8
Eritromicina	0.016-256	≥8
Metronidazol	0.016-256	≥32
Moxifloxacina	0.02-32	≥8
Tetraciclina	0.016-256	≥8
Vancomicina	0.016-256	≥32
Ciprofloxacina	0.002-32	≥8*

\*Dridi et al., 2002

## Resultados

### 1. Especie cunícola

El total de las muestras analizadas fue de 86, de las cuales 32 fueron de conejos y 54 de buitres.

Las 32 muestras de conejos procedían de 8 granjas españolas distintas. Las muestras se tomaron con un hisopo rectal a conejos de engorde para carne. En el muestreo se incluyeron animales sanos y con diarrea (16 animales estaban sanos y 16 presentaban diarrea).

Una vez realizado el aislamiento se obtuvieron dos muestras positivas (6.25%). Ambos animales de los que procedían las muestras pertenecían al grupo de animales con diarrea.

Según los resultados de PCR-ribotipado, ambos aislados de *C. difficile* pertenecían al ribotipo 126, y fueron positivos a los genes de los tres tipos de toxinas (A, B y binaria), como se muestra en la figura 4.

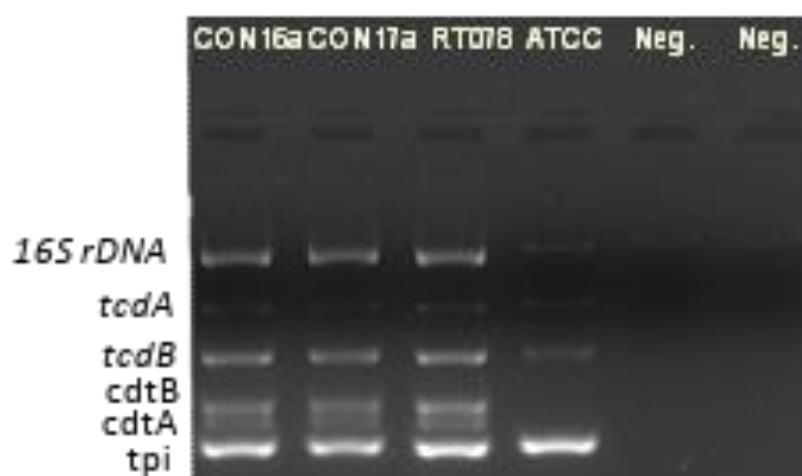


Figura 4: Resultados de la PCR para las muestras de conejos (CON 16a y CON 17a ). El orden de las bandas es: 16S rDNA, tcdA, tcdB, cdtB, cdtA y tpi.

Respecto a la resistencia a antibióticos (tabla 3), ambos aislados presentaron resistencia frente a eritromicina. Uno de ellos presentó además resistencia frente a la clindamicina; mientras que el otro, aunque no presentó resistencia frente a la tetraciclina, tuvo su valor de CMI (concentración mínima inhibitoria) cercano al punto de corte. No se observaron resistencias frente a metronidazol ni vancomicina.

Tabla 3: Resultados de susceptibilidad antimicrobiana (en  $\mu\text{g/ml}$ ) en aislados de conejos. En azul se indican aquellos resultados que se corresponden con cepas de *C. difficile* con resistencias a antibióticos.

Muestra	Clindamicina	Eritromicina	Metronidazol	Moxifloxacina	Tetraciclina	Vancomicina
16	$\geq 256$	$\geq 256$	0,38	0,75	2	3
17	3	$\geq 256$	0,25	0,5	2	2

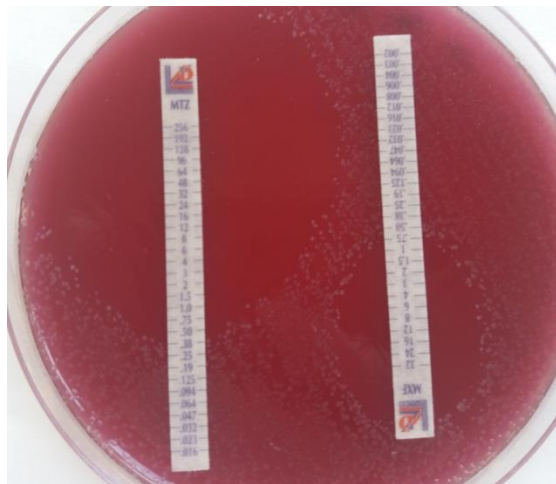


Figura 5: E-test de *C. difficile* aislado de conejo sensible a metronidazol (0,38  $\mu\text{g/ml}$ ) y moxifloxacina (0,75  $\mu\text{g/ml}$ ).

## 2. *Gyps fulvus* (Buitres)

De las 54 muestras analizadas, 3 resultaron positivas (5,55%). De estas, dos procedían de animales adultos y la restante de uno juvenil. Los tres aislados de *C. difficile* resultaron positivos a todos los genes de las toxinas analizadas. Los ribotipos encontrados en este caso fueron el 126 (un aislado) y el 078 (dos aislados).

Respecto al estudio de susceptibilidad a antibióticos (tabla 4), los tres aislados fueron resistentes a ciprofloxacina, dos lo fueron a moxifloxacina y uno a eritromicina. Todos los aislados fueron susceptibles a metronidazol y vancomicina.

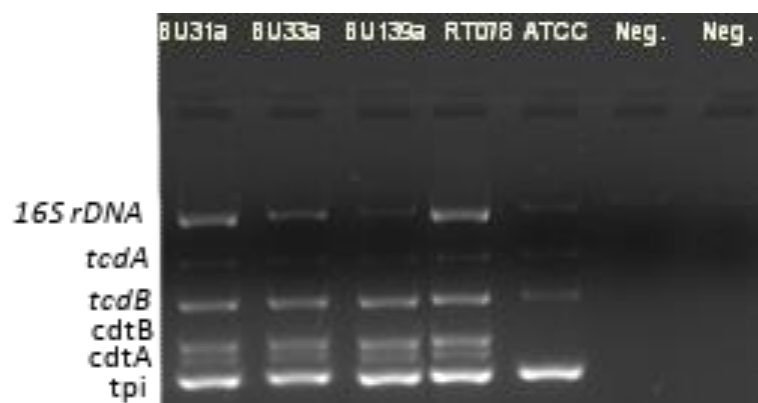


Figura 6: Resultados de la PCR para las muestras de buitres (BU31a, BU33a y BU 139a). El orden de las bandas es: 16S rDNA, tcdA, tcdB, cdtB, cdtA y tpi.

Tabla 4: Resultados de susceptibilidad antimicrobiana (en  $\mu\text{g/ml}$ ) en aislados de buitres. En azul se indica aquellos resultados que se corresponden con cepas de *C. difficile* con resistencias a antibióticos.

Muestra	Clindamicina	Eritromicina	Metronidazol	Moxifloxacina	Tetraciclina	Vancomicina	Ciprofloxacina
31	3	1	0,25	$\geq 32$	3	2	$\geq 32$
33	1,5	$\geq 256$	0,50	1	4	1,5	$\geq 32$
139	3	0,50	0,50	$\geq 32$	6	1,5	$\geq 32$

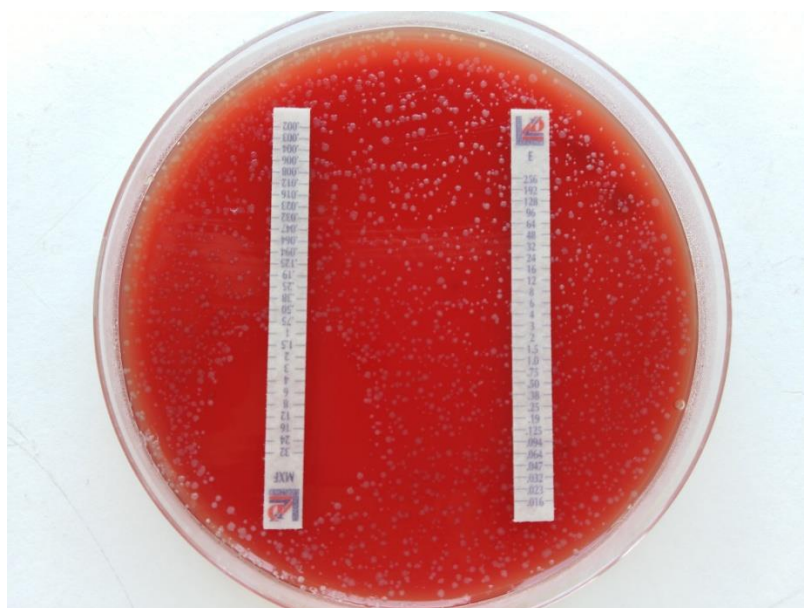


Figura 7: E-test para eritromicina (resistente) y moxiflaxina (sensible) en un aislado de *C. difficile* de buitre. Se observa que *C. difficile* no genera halo ( $\geq 256$ ), mientras que en el caso de moxiflaxina se genera un halo que corta en 1.

## **Discusión**

*Clostridium difficile* es una bacteria habitual en la flora intestinal de animales y humanos, aunque también puede llegar a producir efectos patógenos. En los últimos años ha experimentado un cambio epidemiológico, cobrando especial importancia los ribotipos hipervirulentos 027 y 078, estando este último especialmente ligado a animales. Tomando como referencia los objetivos planteados al inicio del trabajo, se tomaron muestras de dos especies (conejos y buitres) para realizar el aislamiento de *C. difficile*. Con estos resultados se calculó la prevalencia, obteniendo resultados concordantes con otros estudios realizados en España en el caso de los conejos.

Los resultados del estudio muestran que todas las muestras estudiadas que fueron identificadas como *C. difficile* pertenecen a los ribotipos 078 o 126. Ambos son ribotipos frecuentemente aislados en animales.

### **1. Especie cunícola**

En conejos, la prevalencia (6.25 %) fue inferior a la encontrada en otros estudios realizados en España (Andrés-Lasheras et al. (2016b), ya que describieron un 18,5 % de muestras positivas a *C. difficile* en conejos de carne muestreados entre 2012 y 2016), aunque ambos estudios coinciden en que las muestras positivas fueron en su mayoría del ribotipo 126. Otro estudio realizado en conejos en Italia (Drigo et al., 2015) mostró una prevalencia de *C. difficile* de 3%, pero con mayor variabilidad de ribotipos. Esta diferencia entre los estudios realizados en España e Italia podría explicarse por la limitación en la cantidad de muestras (80 entre ambos estudios españoles frente a 1279 en el italiano).

Existen estudios que plantean la posible implicación de *C. difficile* como responsable de diarrea en distintas especies (Alvarez-Perez, 2009). En el caso de este estudio, aunque los resultados son compatibles con la hipótesis de que *C. difficile* causa diarrea, la cantidad de muestras no es suficiente para obtener una asociación significativa entre ambas variables. Existen otras explicaciones posibles para la aparición de diarrea que no han sido valoradas durante la realización de este trabajo, como la presencia de otros agentes patógenos que cursen con un cuadro clínico similar o la edad de los animales.

Todas las muestras positivas resultaron resistentes a la eritromicina. Estos resultados se corresponden con los obtenidos en los estudios anteriormente mencionados, donde se hallaron resultados similares. Una de las muestras presentó resistencia frente a la clindamicina, resultados similares a los obtenidos en otros estudios donde el porcentaje de muestras resistentes a la clindamicina en distintas especies también fue elevado (Peláez et al., 2013; Peng et al., 2017).

Ninguna de las muestras presentó resistencia a la vancomicina ni al metronidazol, antibióticos frecuentemente descritos como de primera elección para el tratamiento de la enfermedad en humanos (Lital Meyer et al., 2014; Peng et al., 2017).

## **2. *Gyps fulvus* (Buitres)**

La prevalencia encontrada en buitres (5,55 %) es menor que la descrita en el ganado porcino (Alvarez-Perez et al., 2009), teniendo en cuenta que estos animales fueron alimentados con carcasas porcinas. La prevalencia en animales de vida salvaje es variable: existen estudios realizados en aves silvestres (aves passeriformes y *Tetrao urogallus cantabricus*) en los que no se aíslan cepas de *C. difficile* (Bandelj et al., 2011, Andrés-Lasheras et al., 2016b), aunque en otros estudios se encontró el 4% de animales (*Hirundo rustica*) positivos (Bandelj et al., 2014). Una posible hipótesis para explicar la presencia de este patógeno en buitres podría ser la transmisión de *C. difficile* por ingestión de cadáveres de cerdo, ya que formaban parte de la alimentación de esta población y los ribotipos identificados son dos de los más prevalentes en el ganado porcino, aunque la cantidad de información sobre *C. difficile* en buitres es baja y son necesarios más estudios para demostrar esta relación.

Todos los aislados de *C. difficile* obtenidos en muestras procedentes de buitres presentaron resistencia a la ciprofloxacina. En otros estudios realizados en aislados procedentes de cerdos, se obtuvieron resultados similares, al evaluar sus susceptibilidades a este antibiótico (Peláez et al., 2013; Keessen et al., 2013). Dos de las muestras estudiadas fueron resistentes a la moxiflaxina, una quinolona de cuarta generación. En 2016, Blanco et al. encontraron residuos de fluoroquinolonas en buitres del centro de España, probablemente ingeridos a través del consumo de canales de cerdos. Por tanto, la detección de cepas de *C. difficile* resistentes a fluoroquinolonas podría deberse bien a la ingestión de cepas resistentes a partir de las canales de cerdos o bien a la ingestión de residuos de antibióticos presentes en estas canales y consiguiente desarrollo de resistencias en la microbiota intestinal. Estos hallazgos, unidos al incremento de las resistencias a las fluoroquinolonas de otras bacterias zoonóticas (EFSA, 2019) en Europa podrían indicar la diseminación de resistencias antibióticas a esta clase de antibióticos en el entorno natural. La resistencia a eritromicina ha sido descrita con frecuencia en otras bacterias entéricas (Pyörälä et al., 2014). Tampoco se observaron en este caso resistencias frente a metronidazol o vancomicina, antibióticos de elección en el tratamiento de la infección por *C. difficile*.

La presencia de *C. difficile* en buitres podría suponer una diseminación de este patógeno en el ambiente, además de que podrían considerarse estos animales como posible reservorio de resistencias antibióticas a otros de vida salvaje y, por tanto, como forma de diseminación de *C.*

*difficile* en el medio ambiente. Esto podría implicar problemas en los ecosistemas y en la conservación de especies (Blanco, 2014). La existencia de cepas resistentes a varios antibióticos en especies salvajes es un riesgo importante a tener en cuenta a la hora de evaluar el impacto ecológico que puede tener sobre las poblaciones silvestres y su implicación en la conservación de las especies, lo cual añade otro punto de controversia al ya existente debate sobre la alimentación de animales de vida libre con restos procedentes de ganadería.

## **Conclusiones**

Tras el análisis e interpretación de los resultados obtenidos en este estudio se concluye lo siguiente:

1. La presencia de *C. difficile* en conejos y su posible asociación con diarrea no puede determinarse de forma significativa debido al bajo número de muestras, aunque los dos aislados de conejos pertenecen al grupo de animales con diarrea.
2. La prevalencia en buitres fue similar a la encontrada en otras especies similares, aunque fue baja al compararla con la encontrada en porcino. La identificación de ribotipos habituales en porcino podría sugerir que el origen de estas bacterias fue la alimentación a base de carcasas de cerdo.
3. Los ribotipos identificados, comunes en especies animales, pertenecen al ribotipo 078 o 126 (ribotipo especialmente relacionado con el 078) y todas presentaron los genes de las tres toxinas (A, B y binaria), lo que se corresponde con los resultados de otros estudios similares, al igual que los patrones de resistencia obtenidos.
4. Es frecuente la presencia de resistencia frente a antibióticos de uso común en aislados de *C. difficile* de la práctica clínica. Destacan las resistencias a la eritromicina en conejos y a la ciprofloxacina en buitres.
5. No se ha encontrado resistencia a vancomicina ni metronidazol en los aislados de *C. difficile* estudiados, antibióticos utilizados como primera elección en la especie humana ante la aparición de cuadros clínicos relacionados con *C. difficile*.



## **Conclusions**

After analyzing the results derived from this study, it can be concluded that:

1. Presence of *C. difficile* in rabbits and its possible association with diarrhea cannot be significantly determined due to low sampling, although two of the positive isolates are part of the group of animals with diarrhea.
2. Prevalence of *C. difficile* in vultures was found equivalent to the studies in similar species, although it was low compared to the prevalence found in swine. The identification of ribotypes commonly found in pigs could mean that the origin of this bacterium was the nourishment with pig carcasses.
3. Identified ribotypes, common in animals, belong to the 078 or 126 ribotype (being 126 ribotype specially related to 078), and all isolates were positive to all toxins (A, B and binary toxin), which matches with the results of similar studies, as well as its antimicrobial resistance patterns.
4. The presence of antibiotic resistance is common in *C. difficile* isolates of clinic practice. Erythromycin resistance in rabbits and ciprofloxacin resistance in vultures are especially relevant.
5. Neither resistance was found for metronidazole nor vancomycin in the *C. difficile* isolates studied. These antibiotics are used as first-choice antibiotics in humans for the treatment of *C. difficile* infection.

## **Valoración personal**

Mi interés sobre este tema nació a raíz de una charla realizada en la universidad sobre el uso responsable de antibióticos. Considero que como profesionales sanitarios es nuestro deber y responsabilidad conocer la situación actual sobre el aumento de la resistencia bacteriana, informar de ello a la población y tratar de evitar en la medida de lo posible que sigan apareciendo estas resistencias. Espero poder seguir estudiando este tema en el futuro y ampliar mis conocimientos con el tiempo sobre este problema de difícil solución.

Durante la realización de este trabajo de fin de grado he podido desarrollar mejor las competencias teóricas y prácticas que he adquirido durante la carrera, destacando especialmente la búsqueda y análisis crítico de información científica, habilidad imprescindible para todo profesional veterinario, tanto en el ámbito académico como en el trabajo de campo o clínica.

En el plano personal, además, la posibilidad de hacer este trabajo me ha despertado especial interés en el campo de la microbiología. Del mismo modo, gracias a los procesos experimentales en el laboratorio y la amabilidad de los profesionales a cargo, he conocido con más profundidad el ambiente y las técnicas empleadas en él, complementando los conocimientos adquiridos al respecto en la carrera, lo que ha afirmado mi resolución de que este es el campo del conocimiento al que deseo dedicarme en un futuro.

### **Agradecimientos**

Son muchas las personas que han estado implicadas en la realización de este trabajo de fin de grado. Para empezar, me gustaría agradecer a Rosa Bolea por darme la oportunidad de desarrollar este tema de investigación y el apoyo brindado durante la redacción de esta memoria. También agradecer a Eloísa Sevilla, por enseñarme las bases de trabajo en el laboratorio y estar siempre presente; y a todo el personal del Departamento de Microbiología por ayudarme siempre que lo necesitaba. Por último, agradecer a Nanta y a Jesús Comenge y Manuel Marco por colaborar en este trabajo aportando las muestras que se han analizado.

## **Consideraciones éticas**

Las muestras procedentes de buitres de este trabajo fueron recogidas originalmente para otro estudio (Marin et al, 2018), incluido en el programa de conservación de especies en peligro de la región de Valencia. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE del parlamento europeo y del consejo de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

## **Bibliografía**

1. Alvarez-Perez, S., Blanco, J. L., Bouza, E., Alba, P., Gibert, X., Maldonado, J. y García, M. E. (2009). Prevalence of *Clostridium difficile* in diarrhoeic and non-diarrhoeic piglets. *Veterinary Microbiology*, 137(3), 302-305. 10.1016/j.vetmic.2009.01.015. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113509000364>
2. Andrés-Lasheras, S., Bolea, R., Mainar-Jaime, R., Kuijper, E., Sevilla, E., Martín-Burriel, I. y Chirino-Trejo, M. (2016a). Presence of *Clostridium difficile* in pig faecal samples and wild animal species associated to pig farms. *Journal of Applied Microbiology*, 12210.1111/jam.13343
3. Andrés-Lasheras, S. (2016b). *Clostridium difficile*. Presencia y diversidad en humanos, animales domésticos y silvestres.
4. Arca-Suárez, J., Galán-Sánchez, F., Cano-Cano, F., García-Santos, G. y Rodríguez-Iglesias, M. A. (2018). Antimicrobial susceptibility and molecular typing of toxigenic clinical isolates of *Clostridium difficile* causing infections in the south of Spain. *Anaerobe*, 54, 146-150. 10.1016/j.anaerobe.2018.09.006. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996418301616>
5. Asensio, A. y Monge, D. (2012). Epidemiología de la infección por *Clostridium difficile* en España. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 30(6), 333-337. 10.1016/j.eimc.2011.09.010. Disponible en <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-epidemiologia-infeccion-por-Clostridium-difficile-S0213005X11003119>
6. Bandelj, P., Trilar, T., Blagus, R., Ocepek, M., Rousseau, J., Weese, J. S. y Vengust, M. (2014). Prevalence and molecular characterization of *Clostridium difficile* isolated from European barn swallows (*Hirundo rustica*) during migration. *BMC Veterinary Research*, 10, 40. 10.1186/1746-6148-10-40
7. Bandelj, P., Trilar, T., Racnik, J., Zdravec, M., Pirš, T., Avbersek, J. y Vengust, M. (2011). Zero prevalence of *Clostridium difficile* in wild passerine birds in Europe. *FEMS Microbiology Letters*, 321(2), 183-185. 10.1111/j.1574-6968.2011.02333.x. Disponible en <https://academic.oup.com/femsle/article/321/2/183/627083>
8. Bauer, M. P. y Kuijper, E. J. (2015). Potential sources of *Clostridium difficile* in human infection. *Infectious Disease Clinics of North America*, 29(1), 29-35. 10.1016/j.idc.2014.11.010

9. Blanco, G. (2014). Can livestock carrion availability influence diet of wintering red kites? Implications of sanitary policies in ecosystem services and conservation. Disponible en <https://esj-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1007/s10144-014-0445-2>
10. Blanco, G., Junza, A., Segarra, D., Barbosa, J. y Barrón, D. (2016). Wildlife contamination with fluoroquinolones from livestock: widespread occurrence of enrofloxacin and marbofloxacin in vultures. *Chemosphere*, 144, 1536-1543. 10.1016/j.chemosphere.2015.10.045 Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004565351530240X>
11. Center for Disease Control and Precenton (2015). Clostridioides difficile infection. Disponible en [https://www.cdc.gov/hai/organisms/cdiff/cdiff\\_infect.html](https://www.cdc.gov/hai/organisms/cdiff/cdiff_infect.html)
12. Clinical and LaboratoryStandards Institute (CLSI). (2014). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and LaboratoryStandardsInstitute.
13. De Briyne, N., Atkinson, J., Pokludová, L. y Borriello, S. P. (2014). Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *The Veterinary Record*, 175(13), 325. 10.1136/vr.102462. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4215272/>
14. Di Bella, S., Ascenzi, P., Siarakas, S., Petrosillo, N. y di Masi, A. (2016). *Clostridium difficile* toxins A and B: insights into pathogenic properties and extraintestinal effects. *Toxins*, 8(5)10.3390/toxins8050134. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4885049/>
15. Dridi, L., Tankovic, J., Burghoffer, B., Barbut, F. y Petit, J. (2002). gyrA and gyrB mutations are implicated in cross-resistance to ciprofloxacin and moxifloxacin in *Clostridium difficile*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(11), 3418-3421. 10.1128/AAC.46.11.3418-3421.2002. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC128732/>
16. Drigo, I., Mazzolini, E., Bacchin, C., Tonon, E., Puiatti, C., Bano, L. y Agnoletti, F. (2015). Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from rabbits raised for meat production. *Veterinary Microbiology*, 181(3), 303-307. 10.1016/j.vetmic.2015.10.005. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113515300456>
17. Edwards, A. N., Karim, S. T., Pascual, R. A., Jowhar, L. M., Anderson, S. E. y McBride, S. M. (2016). Chemical and stress resistances of *Clostridium difficile* spores and vegetative cells. *Frontiers in Microbiology*, 710.3389/fmicb.2016.01698 Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5080291/>

18. Elliott, B., Dingle, K. E., Didelot, X., Crook, D. W. y Riley, T. V. (2014). The complexity and diversity of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile* clade 5. *Genome Biology and Evolution*, 6(12), 3159-3170. 10.1093/gbe/evu248
19. European Medicines Agency (EMA), European surveillance of veterinary antimicrobial consumption (2018). Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2016. (EMA/275982/2018).
20. European Food Safety Authority (EFSA) (2019) The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. *EFSA Journal*, 17(2), e05598. 10.2903/j.efsa.2019.5598 Disponible en <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/j.efsa.2019.5598>
21. Fairley, D. J., McKenna, J. P., Stevenson, M., Weaver, J., Gilliland, C., Watt, A. y Coyle, P. V. (2015). Association of *Clostridium difficile* ribotype 078 with detectable toxin in human stool specimens. *Journal of Medical Microbiology*, 64(11), 1341-1345. 10.1099/jmm.0.000165 Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26354090>
22. Fawley, W. N., Knetsch, C. W., MacCannell, D. R., Harmanus, C., Du, T., Mulvey, M. R. y Wilcox, M. H. (2015). Development and validation of an internationally-standardized, high-resolution capillary gel-based electrophoresis PCR-ribotyping protocol for *Clostridium difficile*. *Plos One*, 10(2). 10.1371/journal.pone.0118150 Disponible en <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0118150>
23. Gebreyes, W. A. y Adkins, P. R. F. (2015). The use of pulsed-field gel electrophoresis for genotyping of *Clostridium difficile*. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1301, 95-101. 10.1007/978-1-4939-2599-5\_9
24. Gerding, D. N., Johnson, S., Rupnik, M. y Aktories, K. (2014). *Clostridium difficile* binary toxin CDT. *Gut Microbes*, 5(1), 15-27. 10.4161/gmic.26854 Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4049931/>
25. Goudarzi, M., Seyedjavadi, S. S., Goudarzi, H., Mehdizadeh Aghdam, E. & Nazeri, S. (2014). *Clostridium difficile* infection: epidemiology, pathogenesis, risk factors, and therapeutic options. Disponible en <https://www.hindawi.com/journals/scientifica/2014/916826/>
26. Griffiths, D., Fawley, W., Kachrimanidou, M., Bowden, R., Crook, D. W., Fung, R. y Dingle, K. E. (2010). Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(3), 770-778. 10.1128/JCM.01796-09
27. Jabbar, U., Leischner, J., Kasper, D., Gerber, R., Sambol, S. P., Parada, J. P. y Gerding, D. N. (2010). Effectiveness of alcohol-based hand rubs for removal of *Clostridium difficile* spores from hands. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 31(6), 565-570. 10.1086/652772

28. Kim, H., Cho, A., Kim, J. W., Kim, H. y Kim, B. (2018). High prevalence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 in pigs in Korea. *Anaerobe*, 51, 42-46. 10.1016/j.anaerobe.2018.03.012
29. Knetsch, C. W., Connor, T. R., Mutreja, A., van Dorp, S. M., Sanders, I. M., Browne, H. P. y Lawley, T. D. (2014). Whole genome sequencing reveals potential spread of *Clostridium difficile* between humans and farm animals in the Netherlands, 2002 to 2011. *Euro Surveillance: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles (European Communicable Disease Bulletin)*, 19(45), 20954. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4518193/>
30. Knetsch, C. W., Kumar, N., Forster, S. C., Connor, T. R., Browne, H. P., Harmanus, C. y Lawley, T. D. (2018). Zoonotic transfer of *Clostridium difficile* harboring antimicrobial resistance between farm animals and humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(3)10.1128/JCM.01384-17  
Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5824051/>
31. Knight, D. R., Kullin, B., Androga, G. O., Barbut, F., Eckert, C., Johnson, S. y Riley, T. V. (2019). Evolutionary and genomic insights into *Clostridioides difficile* sequence type 11: a diverse zoonotic and antimicrobial-resistant lineage of global one health importance. *mBio*, 10(2). 10.1128/mBio.00446-19
32. Krishna, M. M., Powell, N. B. L. Y Borriello, S. P. (1996). Cell surface properties of *Clostridium difficile*: haemagglutination, relative hydrophobicity and charge. *Journal of Medical Microbiology*, 44(2), 115-123. 10.1099/00222615-44-2-115. Disponible en <https://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/00222615-44-2-115>
33. Lawson, P. A., Citron, D. M., Tyrrell, K. L. y Finegold, S. M. (2016). Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe*, 40, 95-99. 10.1016/j.anaerobe.2016.06.008
34. Li, S., Shi, L., Yang, Z., Zhang, Y., Perez-Cordon, G., Huang, T., Ramsey, J., Oezguen, N., Savidge, T.C. y Feng, H. (2015). Critical roles of *Clostridium difficile* toxin B enzymatic activities in pathogenesis. *Infection and Immunity*, 83(2), 502-513. 10.1128/IAI.02316-14. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25404023>
35. Lital Meyer, S., Ricardo Espinoza, A. y Rodrigo Quera, P. (2014). Infección por *Clostridium difficile*: epidemiología, diagnóstico y estrategias terapéuticas. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(3), 473-484. 10.1016/S0716-8640(14)70064-1. Disponible en <http://www.elsevier.es/es-revista-revista-medica-clinica-las-condes-202-articulo-infeccion-por-Clostridium-difficile-epidemiologia-S0716864014700641>
36. Lyon, S. A., Hutton, M. L., Rood, J. I., Cheung, J. K. y Lyras, D. (2016). CdtR regulates TcdA and TcdB production in *Clostridium*

- difficile*. *PLoSPathogens*, 12(7)10.1371/journal.ppat.1005758.Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4944984/>
37. Marin, C., Torres, C., Marco-Jiménez, F., Cerdà-Cuéllar, M., Sevilla, S., Ayats, T., & Vega, S. (2018). Supplementary feeding stations for conservation of vultures could be an important source of monophasic salmonella typhimurium1,4,[5],12:i:-. *Science of the Total Environment*, 636, 449-455. 10.1016/j.scitotenv.2018.04.310. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969718314888>
  38. Marín-Arriaza, M., Alcalá-Hernández, L., Mena-Ribas, A. y Niubó-Bosh, J. (2016). Diagnóstico microbiológico de la infección por *Clostridium difficile*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(34), 595-602. 10.1016/j.eimc.2015.09.004.Disponible en <https://medes.com/publication/115555>
  39. Peláez, T., Alcalá, L., Blanco, J. L., Álvarez-Pérez, S., Marín, M., Martín-López, A. y Bouza, E. (2013). Characterization of swine isolates of *Clostridium difficile* in Spain: a potential source of epidemic multidrug resistant strains? *Anaerobe*, 22, 45-49. 10.1016/j.anaerobe.2013.05.009. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996413000905>
  40. Peng, Z., Jin, D., Kim, H. B., Stratton, C. W., Wu, B., Tang, Y. y Sun, X. (2017). Update on antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*: resistance mechanisms and antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(7), 1998-2008. 10.1128/JCM.02250-16 Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28404671>
  41. Perkins, S. E., Fox, J. G., Taylor, N. S., Green, D. L. y Lipman, N. S. (1995). Detection of *Clostridium difficile* toxins from the small intestine and cecum of rabbits with naturally acquired enterotoxemia. *Laboratory Animal Science*, 45(4), 379-384.
  42. Persson, S., Torpdahl and, M. y Olsen, K. E. P. (2008). New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (tcdA) and toxin B (tcdB) and the binary toxin (cdtA/cdtB) genes applied to a Danish strain collection. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(11), 1057-1064. 10.1111/j.1469-0691.2008.02092.x.Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14618176>
  43. Public databases for molecular typing (PubMLST) (2018). PubMLST.Disponible en <https://pubmlst.org/>
  44. Pyörälä, S., Baptiste, K. E., Catry, B., van Duijkeren, E., Greko, C., Moreno, M. A. y Törneke, K. (2014). Macrolides and lincosamides in cattle and pigs: use and development of antimicrobial resistance. *The Veterinary Journal*, 200(2), 230-239.

- 10.1016/j.tvjl.2014.02.028.Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023314000823>
45. Quinn, P. J., Markey, B. K., Hartigan, P., Fanning, S., FitzPatrick, E. S. y Leonard, F. C. (2011). *Veterinary microbiology and microbial disease*. Disponible en [https://ebookcentral.proquest.com/lib/\[SITE\\_ID\]/detail.action?docID=819153](https://ebookcentral.proquest.com/lib/[SITE_ID]/detail.action?docID=819153)
  46. Scaria, J., Chen, J., Useh, N., He, H., McDonough, S. P., Chunhong Mao, C., Sobral, B. y Chang, Y.F. (2014). Comparative nutritional and chemical phenome of *Clostridium difficile* isolates determined using phenotype microarrays. *International Journal of Infectious Diseases*, 27(C), 20-25. 10.1016/j.ijid.2014.06.018.Disponible en <https://www.clinicalkey.es/playcontent/1-s2.0-S1201971214015781>
  47. Spigaglia, P. (2016). Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in *Clostridium difficile* infection. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 3(1), 23-42. 10.1177/2049936115622891.Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4735502/>
  48. Stein, K., Egan, S., Lynch, H., Harmanus, C., Kyne, L., Herra, C yDrudy, D. (2017). PCR-ribotype distribution of *Clostridium difficile* in Irish pigs. *Anaerobe*, 48, 237-241. 10.1016/j.anaerobe.2017.10.004
  49. Vardakas, K. Z., Polyzos, K. A., Patouni, K., Rafailidis, P. I., Samonis, G. yFalagas, M. E. (2012). Treatment failure and recurrence of *Clostridium difficile* infection following treatment with vancomycin or metronidazole: a systematic review of the evidence.*International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(1), 1-8. 10.1016/j.ijantimicag.2012.01.004
  50. Voth, D. E. y Ballard, J. D. (2005). *Clostridium difficile* toxins: Mechanism of action and role in disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(2), 247-263. 10.1128/CMR.18.2.247-263.2005 Disponible en <http://cmr.asm.org/content/18/2/247.abstract>
  51. Yaeger, M. J., Kinyon, J. M. y Glenn Songer, J. (2007). A prospective, case control study evaluating the association between *Clostridium difficile* toxins in the colon of neonatal swine and gross and microscopic lesions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 19(1), 52-59. 10.1177/104063870701900108
  52. Yakob, L., Riley, T. V., Paterson, D. L., Marquess, J., Magalhaes, R. J. S., Furuya-Kanamori, L. yClements, A. C. A. (2015). Mechanisms of hypervirulent *Clostridium difficile* ribotype 027 displacement of endemic strains: an epidemiological model. *Scientific Reports*, 5, 12666. 10.1038/srep12666.Disponible en <https://www.nature.com/articles/srep12666>